

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-66141

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)3月25日

G 01 N 21/03
21/64
33/5437458-2G
7458-2G
D-7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 螢光免疫測定法用容器

⑯ 特 願 昭60-205391

⑰ 出 願 昭60(1985)9月19日

⑱ 発 明 者 渡 辺 芳 明 東京都千代田区内幸町1丁目2番2号 住友ベークライト株式会社内

⑲ 発 明 者 加 藤 武 司 東京都千代田区内幸町1丁目2番2号 住友ベークライト株式会社内

⑳ 出 願 人 住友ベークライト株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目2番2号

明 細 書

1. 発明の名称

螢光免疫測定法用容器

2. 特許請求の範囲

(1) 螢光を発する試料を保持する容器であって、試料と接しない外側表面ないしは内層に、螢光を反射する層を形成させた事の特徴とする螢光免疫測定法用容器。

(2) 螢光を反射する層が、金属または金属を含有する物質よりなる事の特徴とする特許請求の範囲第1項記載の螢光免疫測定法用容器。

(3) 試料と接する面がプラスチックよりなる事の特徴とする特許請求の範囲第1項記載の螢光免疫測定法用容器。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は免疫検査の一手法である螢光免疫測定法に用いられる試料容器に関するものである。

〔従来技術〕

螢光分析は極微量分析の一手法として広く利用されているが、今日ではこの測定技術を応用した免疫検査法である螢光免疫測定法が臨床検査にとり入れられつつある。この測定法は一般に酵素免疫測定法と呼ばれている手法を発展させた高感度の免疫測定法で、これまで最も感度が高いといわれた放射免疫測定法を上まわる程の微量測定が可能であるといわれている。この測定法は、容器の内側表面に抗原（もしくは抗体）を吸着固定し、次いで抗体（もしくは抗原）を加えて抗原-抗体反応を順次行なわせ、最後に酵素を標識した抗体（もしくは抗原）を反応させる。さらに、検体に固定されたこの酵素に対して螢光基質（酵素による反応で螢光を発する物質）を加え、これに励起光を照射し、試料が発する螢光量を読み取る、というものである。

螢光免疫測定法に用いるための容器としては従来、特開昭59-132335号公報が知られている。これは容器を構成する材料自体が発する自己螢光を抑えて、試料が発する螢光を精度よく検知しよ

うとするもので、具体的には、容器を構成するプラスチック材料に顔料を練り込むもしくはコーティングし、励起光の成形品内部への侵入を阻止することにより自己発光の発生を減少させようとしたものである。しかしながら、特開昭60-6868号公報にも開示されているように、プラスチック材料に顔料等の添加物を加えた場合その表面における抗原（もしくは抗体）等の吸着性に不均一性を生ずるという問題があり、蛍光免疫測定法に用いるための容器として必ずしも適切なものであるとはいえない。

一方、自己発光が小さく、実際の蛍光測定には殆んど影響を与えない低発光材料も数多く市販されており、また測定機器の方も、励起波長、蛍光波長のいずれに対しても精度の高い対応が可能で、バックグラウンドとなる自己発光も自動的に補正されるように改良されている。従って、蛍光免疫測定のために低自己発光の容器を用いることは必ずしも必要とはされないが、試料の発する蛍光を効率よく、より多く捕集することができれば、微

などの蛋白質を容器表面に吸着、固定し反応を行なわせるが、一般に金属への蛋白質の吸着は不安定で均一な再現性のある結果は望めない。これに対してプラスチックへの吸着は安定で、プラスチック表面の容器を用いれば確度の高い測定を行なうことが可能である。従って、蛋白質を吸着させる面と反射層は別層でなければならぬ。このような条件を実現する容器としては、例えば、第1図に示したプラスチック成形品(1)の外側表面に反射層(2)を設けた容器、第2図に示した成形容器(4)の内側表面に反射層(2)を設け、さらにその上にプラスチック表面層(3)を設けた容器（即ち、反射層(2)を内層とする）などが用いられる。

蛍光を反射する層(2)は、金属ないし金属を含む物質からなる。

本発明で用いることのできる金属としては、銀、水銀、金、白金、銅、アルミニウム、ニッケル、チタン、クロム、インジウム等の他、水銀アマルガムや上記金属の合金であってもよく、また、金属を含む物質としては、金属の微粒子を樹

弱な蛍光であっても一層感度の高い測定が可能となるのであり、そのような潜在的なニーズは多い。

本発明者らは、このようなニーズに応えるため種々の方法について検討を行ない、容器の内側に向って蛍光を反射する層を設けることによって測定感度を高め得ることを見出し、鋭意研究を進めて本発明を完成させるに至ったものである。

〔発明の目的〕

即ち本発明の目的は、高感度の測定を可能にする蛍光免疫測定法用容器を提供するにある。

〔発明の構成〕

本発明は、蛍光を発する試料を保持する容器であって、試料と接しない外側表面ないしは内層に、蛍光を反射する層を形成させた事を特徴とする蛍光免疫測定法用容器である。

容器の形状としては、マイクロプレート、キュベット、試験管、スピッツ、反応板などがあるが、用途に応じて選ばれるものであり特に限定されるものではない。

蛍光免疫測定法では、前述のとおり抗原、抗体

脂中に分散させた銀ペースト、金属ペイント等を挙げることができる。プラスチック成形品(1)や成形容器(4)の表面に金属ないし金属を含む物質よりなる反射層(2)を形成する方法としては、金属のメッキ、蒸着、スパッタリング、イオンプレーティング、また、金属を含む物質のコーティング等があるが、これらの方法に限定されるものではない。

反射層(2)の表面にプラスチック表面層(3)を形成する方法としては、プラスチックの溶液、エマルジョン等をコーティング、あるいはその中に容器をディッピングする方法の他、プラズマ重合等によりプラスチック層で被覆する方法も用いられる。

プラスチック成形品(1)およびプラスチック表面層(3)を形成するプラスチックとしては、自己発光の少ない透明なものであればどのようなものでもよいが、たとえばポリスチレン、ポリ塩化ビニール、ポリメチルメタアクリレートなどが好適であり、さらに、その表面が抗原、抗体等の蛋白質の吸着性を改善するための処理が加えられていても何ら差しつかえない。また、本発明では容器のプラス

チック層を通して蛍光を反射増幅させるため、この層内での蛍光損失を少なくする意味で層厚は薄い方が好ましい。

また反射層(2)となる金属層の厚さは、反射機能を保持しているならば特に限定されるものではない。成形容器(4)を形成する材質としてはプラスチックの他、ガラス、セラミック、金属等も使用することができ、特に限定されない。プラスチックを使用する場合でも、上記のような自己蛍光性や透明性の制約はなく、ポリエチレン、ポリプロピレン等を含めて各種のプラスチックを使用することができる。また、金属を使用する場合は、その内側表面を鏡面に仕上げることににより反射層(2)の形成が不要になる利点がある。また、第2図における反射層(2)を、銀ペースト、金属ペイント等を用いて形成させた場合は、その表面は実質的に樹脂層(プラスチック)からなっており、プラスチック表面層(3)の形成を省略することが可能である。(発明の効果)

本発明の蛍光免疫測定法用容器を用いる事に

第 1 表

ポリスチレン製マイクロプレート

種 類	S 社 Sタイプ	S 社 アミノ タイプ	A 社	B 社	C 社
蛍光強度	11	6	14	8	5

ポリ塩化ビニール製マイクロプレート

種 類	D 社	E 社	F 社	G 社 Aタイプ	G 社 HA タイプ
蛍光強度	80	60	240	1	13

<実施例1>

プラスチック容器として住友ベークライト鋳製エリザ用プレートアミノ化タイプ(ポリスチレン製、品番MS-3696F)を用いて、これに蛍光反射層を形成した。反射層としてはアルミニウムの薄膜を、日本真空工業社製スパッタリング装置を

より、高感度の測定が可能である。即ち本発明による反射層が測定試料の発する蛍光を反射する事により、測定機の感ずる蛍光強度が増大する。これにより、従来強度が弱く正確な測定が行えなかった極微量域の測定も、高い精度で測定が可能となる。

以下比較例、実施例をあげて本発明をより具体的に説明する。

<参考例1>

蛍光免疫測定法用容器として、各社のポリスチレンおよびポリ塩化ビニール製のマイクロプレートを用いて自己蛍光の比較を行った。

蛍光測定機は、ダイナテック社製マイクロフルオール(Micro FLUOR、商品名)を用いた。励起波長、蛍光波長はそれぞれ365nm、450nmで測定を行った。この波長は代表的な蛍光試薬4-メチルウンベリフェロンの測定波長に相当する。結果は第1表に示した通りで、一部を除き、その大半が低自己蛍光であることが分かる。

用いて5mAで120分処理する事により、成形品の外側表面に形成した。

プレートの各ウエルに、4-メチルウンベリフェロンの水溶液を $10^{-5} \sim 10^{-8}$ Mの濃度で100 μ L加えた。参考例1と同じ蛍光測定機を用い同様の波長で蛍光強度を測定した。なお比較例として、反射層を形成していないプレートを用いて同様の測定を行った。第2表に示したとおり、本発明による容器を用いた場合蛍光強度が増大することが分かる。

第 2 表

濃度 M		10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
プレート	比較例	5	45	520	1039
	実施例	18	238	1014	4202

<実施例2>

フロー社製マイクロプレート（ポリ塩化ビニール製、HAタイプ）を用いて、成形品の外側表面に銀メッキを行った。

このプレートに、 β -D-ガラクトシダーゼ（シグマ社製、以下 β -Gal）を $10^{-2} \sim 10^{-5}$ mg/mlの濃度で100 μ l/ウェル入れ、4℃で18時間静置した。生理食塩水で洗浄した後、さらに 3×10^{-4} Mの4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド（コッホーライト社製）を50 μ l/ウェル加え室温で30分間反応させた。グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液（PH10.3）を200 μ l/ウェル加えて反応を停止させ、実施例1と同様にして測定を行った。比較例としてメッキ処理を施さないプレートについても同様の測定を行った。第3表に示したとおり、本発明の反射層の効果が大きいことが分かる。

		第 3 表			
プレート	β -Gal濃度 mg/ml				
		10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
実施例	銀メッキ プレート	75	199	568	856
比較例	未処理 プレート	32	62	154	271

4. 図面の簡単な説明

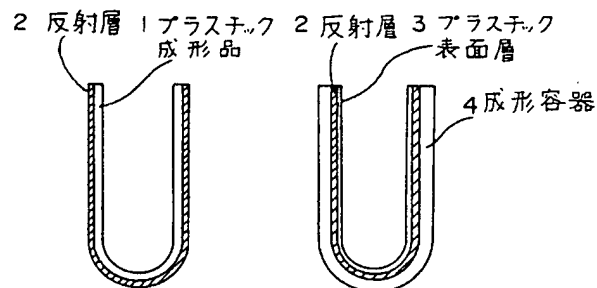
第1図および第2図は、本発明の一実施例となる層構成を説明するための図で、第1図はプラスチック成形品の外側表面に反射層を設けた容器、第2図は成形容器とその内側のプラスチック表面層との間（内層）に反射層を設けた容器である。

特許出願人

住友ベークライト株式会社

第 1 図

第 2 図



⑫ 公開特許公報(A)

昭62-66141

⑮ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)3月25日

G 01 N 21/03
21/64
33/5437458-2G
7458-2G
D-7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 螢光免疫測定法用容器

⑰ 特 願 昭60-205391

⑱ 出 願 昭60(1985)9月19日

⑲ 発 明 者 渡 辺 芳 明 東京都千代田区内幸町1丁目2番2号 住友ベークライト株式会社内

⑲ 発 明 者 加 藤 武 司 東京都千代田区内幸町1丁目2番2号 住友ベークライト株式会社内

⑲ 出 願 人 住友ベークライト株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目2番2号

明 細 書

1. 発明の名称

螢光免疫測定法用容器

2. 特許請求の範囲

(1) 螢光を発する試料を保持する容器であって、試料と接しない外側表面ないしは内層に、螢光を反射する層を形成させた事を特徴とする螢光免疫測定法用容器。

(2) 螢光を反射する層が、金属または金属を含有する物質よりなる事を特徴とする特許請求の範囲第1項記載の螢光免疫測定法用容器。

(3) 試料と接する面がプラスチックよりなる事を特徴とする特許請求の範囲第1項記載の螢光免疫測定法用容器。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は免疫検査の一手法である螢光免疫測定法に用いられる試料容器に関するものである。

〔従来技術〕

螢光分析は極微量分析の一手法として広く利用されているが、今日ではこの測定技術を応用した免疫検査法である螢光免疫測定法が臨床検査にとり入れられつつある。この測定法は一般に酵素免疫測定法と呼ばれている手法を発展させた高感度の免疫測定法で、これまで最も感度が高いといわれた放射免疫測定法を上まわる程の微量測定が可能であるといわれている。この測定法は、容器の内側表面に抗原(もしくは抗体)を吸着固定し、次いで抗体(もしくは抗原)を加えて抗原-抗体反応を順次行なわせ、最後に酵素を標識した抗体(もしくは抗原)を反応させる。さらに、検体に固定されたこの酵素に対して螢光基質(酵素による反応で螢光を発する物質)を加え、これに励起光を照射し、試料が発する螢光量を読み取る、というものである。

螢光免疫測定法に用いるための容器としては従来、特開昭59-132335号公報が知られている。これは容器を構成する材料自体が発する自己螢光を抑えて、試料が発する螢光を精度よく検知しよ

りとするもので、具体的には、容器を構成するプラスチック材料に顔料を練り込むかもしくはコーティングし、励起光の成形品内部への浸入を阻止することにより自己蛍光の発生を減少させようとしたものである。しかしながら、特開昭60-6868号公報にも開示されているように、プラスチック材料に顔料等の添加物を加えた場合その表面における抗原（もしくは抗体）等の吸着性に不均一性を生ずるという問題があり、蛍光免疫測定法に用いるための容器として必ずしも適切なものであるとはいえない。

一方、自己蛍光が小さく、実際の蛍光測定には殆んど影響を与えない低蛍光材料も数多く市販されており、また測定機器の方も、励起波長、蛍光波長のいずれに対しても精度の高い対応が可能で、バックグラウンドとなる自己蛍光も自動的に補正されるように改良されている。従って、蛍光免疫測定のために低自己蛍光の容器を用いることは必ずしも必要とはされないが、試料の発する蛍光を効率よく、より多く捕集することができれば、微

などの蛋白質を容器表面に吸着、固定し反応を行なわせるが、一般に金属への蛋白質の吸着は不安定で均一な再現性のある結果は望めない。これに対してプラスチックへの吸着は安定で、プラスチック表面の容器を用いれば精度の高い測定を行なうことが可能である。従って、蛋白質を吸着させる面と反射層は別層でなければならぬ。このような条件を実現する容器としては、例えば、第1図に示したプラスチック成形品(1)の外側表面に反射層(2)を設けた容器、第2図に示した成形容器(4)の内側表面に反射層(2)を設け、さらにその上にプラスチック表面層(3)を設けた容器（即ち、反射層(2)を内層とする）などが用いられる。

蛍光を反射する層(2)は、金属ないし金属を含む物質からなる。

本発明で用いることのできる金属としては、銀、水銀、金、白金、銅、アルミニウム、ニッケル、チタン、クロム、インジウム等の他、水銀アマルガムや上記金属の合金であってもよく、また、金属を含む物質としては、金属の微粒子を樹

脂中に分散させた銀ペースト、金属ペイント等を用いることができる。プラスチック成形品(1)や成形容器(4)の表面に金属ないし金属を含む物質よりなる反射層(2)を形成する方法としては、金属のメッキ、蒸着、スパッタリング、イオンプレーティング、また、金属を含む物質のコーティング等があるが、これらの方法に限定されるものではない。

反射層(2)の表面にプラスチック表面層(3)を形成する方法としては、プラスチックの溶液、エマルジョン等をコーティング、あるいはその中に容器をディッピングする方法の他、プラズマ重合等によりプラスチック層で被覆する方法も用いられる。

〔発明の目的〕

即ち本発明の目的は、高感度の測定を可能にする蛍光免疫測定法用容器を提供するにある。

〔発明の構成〕

本発明は、蛍光を発する試料を保持する容器であって、試料と接しない外側表面ないしは内層に、蛍光を反射する層を形成させた事を特徴とする蛍光免疫測定法用容器である。

容器の形状としては、マイクロプレート、キュベット、試験管、スピッツ、反応板などがあるが、用途に応じて選ばれるものであり特に限定されるものではない。

蛍光免疫測定法では、前述のとおり抗原、抗体

脂中に分散させた銀ペースト、金属ペイント等を用いることができる。プラスチック成形品(1)や成形容器(4)の表面に金属ないし金属を含む物質よりなる反射層(2)を形成する方法としては、金属のメッキ、蒸着、スパッタリング、イオンプレーティング、また、金属を含む物質のコーティング等があるが、これらの方法に限定されるものではない。

反射層(2)の表面にプラスチック表面層(3)を形成する方法としては、プラスチックの溶液、エマルジョン等をコーティング、あるいはその中に容器をディッピングする方法の他、プラズマ重合等によりプラスチック層で被覆する方法も用いられる。

プラスチック成形品(1)およびプラスチック表面層(3)を形成するプラスチックとしては、自己蛍光の少ない透明なものであればどのようなものでもよいが、たとえばポリスチレン、ポリ塩化ビニール、ポリメチルメタクリレートなどが好適であり、さらに、その表面が抗原、抗体等の蛋白質の吸着性を改善するための処理が加えられていても何ら差しつかえない。また、本発明では容器のプラス

チック層を通して蛍光を反射増幅させるため、この層内での蛍光損失を少なくする意味で層厚は薄い方が好ましい。

また反射層(2)となる金属層の厚さは、反射機能を保持しているならば特に限定されるものではない。成形容器(4)を形成する材質としてはプラスチックの他、ガラス、セラミック、金属等も使用することができ、特に限定されない。プラスチックを使用する場合でも、上記のような自己蛍光性や透明性の制約はなく、ポリエチレン、ポリプロピレン等を含めて各種のプラスチックを使用することができる。また、金属を使用する場合は、その内側表面を鏡面に仕上げることににより反射層(2)の形成が不要になる利点がある。また、第2図における反射層(2)を、銀ペースト、金属ペイント等を用いて形成させた場合は、その表面は実質的に樹脂層(プラスチック)からなっており、プラスチック表面層(3)の形成を省略することが可能である。(発明の効果)

本発明の蛍光免疫測定法用容器を用いる事に

第 1 表

ポリスチレン製マイクロプレート

種 類	S 社 Sタイプ	S 社 アミノ タイプ	A 社	B 社	C 社
蛍光強度	11	6	14	8	5

ポリ塩化ビニール製マイクロプレート

種 類	D 社	E 社	F 社	G 社 Aタイプ	G 社 HA タイプ
蛍光強度	80	60	240	1	13

<実施例1>

プラスチック容器として住友ベークライト製エリザ用プレートアミノ化タイプ(ポリスチレン製、品番MS-3696F)を用いて、これに蛍光反射層を形成した。反射層としてはアルミニウムの薄膜を、日本真空工業社製スパッタリング装置を

より、高感度の測定が可能である。即ち本発明による反射層が測定試料の発する蛍光を反射する事により、測定機の感ずる蛍光強度が増大する。これにより、従来強度が弱く正確な測定が行えなかった極微量域の測定も、高い精度で測定が可能となる。

以下比較例、実施例をあげて本発明をより具体的に説明する。

<参考例1>

蛍光免疫測定法用容器として、各社のポリスチレンおよびポリ塩化ビニール製のマイクロプレートを用いて自己蛍光の比較を行った。

蛍光測定機は、ダイナテック社製マイクロフルオール(Micro FLUOR、商品名)を用いた。励起波長、蛍光波長はそれぞれ365nm、450nmで測定を行った。この波長は代表的な蛍光試薬4-メチルウンベリフェロンの測定波長に相当する。結果は第1表に示した通りで、一部を除き、その大半が低自己蛍光であることが分かる。

用いて5mAで120分処理する事により、成形品の外側表面に形成した。

プレートの各ウエルに、4-メチルウンベリフェロンの水溶液を $10^{-8} \sim 10^{-6}$ Mの濃度で100 μ L加えた。参考例1と同じ蛍光測定機を用い同様の波長で蛍光強度を測定した。なお比較例として、反射層を形成していないプレートを用いて同様の測定を行った。第2表に示したとおり、本発明による容器を用いた場合蛍光強度が増大することが分かる。

第 2 表

濃度 M		10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
プレート	比較例	5	45	520	1039
	実施例	18	238	1014	4202

<実施例2>

フロー社製マイクロプレート（ポリ塩化ビニル製、HAタイプ）を用いて、成形品の外側表面に銀メッキを行った。

このプレートに、 β -D-ガラクトシダーゼ（シグマ社製、以下 β -Gal）を $10^{-2} \sim 10^{-5}$ mg/mlの濃度で100 μ l/ウェル入れ、4℃で18時間静置した。生理食塩水で洗浄した後、さらに 3×10^{-4} Mの4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド（コッホーライト社製）を50 μ l/ウェル加え室温で30分間反応させた。グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液（PH10.3）を200 μ l/ウェル加えて反応を停止させ、実施例1と同様にして測定を行った。比較例としてメッキ処理を施さないプレートについても同様の測定を行った。第3表に示したとおり、本発明の反射層の効果が大きいことが分かる。

β -Gal濃度 mg/ml プレート		第 3 表			
		10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
実施例	銀メッキ プレート	75	199	568	856
比較例	未処理 プレート	32	62	154	271

4. 図面の簡単な説明

第1図および第2図は、本発明の一実施例となる層構成を説明するための図で、第1図はプラスチック成形品の外側表面に反射層を設けた容器、第2図は成形容器とその内側のプラスチック表面層との間（内層）に反射層を設けた容器である。

特許出願人

住友ベークライト株式会社

第 1 図

第 2 図

